

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppiseaduste valdkond

Keemia Instituut

Aleksander Abramov

Kaaliumjodiidi katalüüsitud kaitstud hüdrasiinide alküülimine

Bakalaureusetöö

Keemia

12 EAP

Juhendaja: MSc Anton Mastitski

Tartu 2016

Sisukord

	Töös kasutatud lühendid	3
1.	Sissejuhatus	4
2.	Kirjanduse ülevaade	5
2.1	Ajalooline tähtsus, omadused ja rakendused	5
2.2	Peamised sünteesimeetodid	8
2.2.1	<i>Redutseeriv alküülimine</i>	9
2.2.2	<i>Otsene hüdrasiinide alküülimine</i>	10
2.2.3	<i>Alküülhüdrasiinide kaitsmine</i>	12
2.3	Finkelsteini reaktsioon	12
3.	Eksperimentaalne osa	14
3.1	Kasutatud aparatuur	14
3.2	Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused	14
3.3	Sünteesiskeemid	15
3.3.1	<i>N-(Fmoc-; Boc-; Z-) kaitstud asa-türosiini prekursorite süntees</i>	15
3.3.2	<i>KI poolt katalüüsitud kaitstud hüdrasiinide bensüülimine</i>	16
3.3.3	<i>KI poolt katalüüsitud kaitstud hüdrasiinide alküülimine</i>	16
	<i>halogenoetaanhappe estritega</i>	
3.4	Üldised sünteesi meetodid ja sünteesitud ainete iseloomustused	17
3.4.1	<i>9H-fluoreen-9-üülmetüülkarbasaat (Fmoc-NHNH₂)</i>	17
3.4.2	<i>Bensüülkarbasaat (Z-NHNH₂)</i>	17
3.4.3	<i>tert-butüül 4-metüülfenüülkarbonaat (O-Boc-p-kresool)</i>	18
3.4.4	<i>4-(tert-butüüloksükarbonüüloksü)bensüülbromiid</i>	18
3.4.5	<i>Üldine protseduur kaitstud hüdrasiinide bensüülimiseks</i>	18
3.4.6	<i>Üldine protseduur kaitstud hüdrasiinide alküülimiseks</i>	21
	<i>halogenoetaanhappe estritega</i>	
4.	Tulemused ja arutelu	23
4.1	9H-fluoreen-9-üülmetüülkarbasaat (Fmoc-NHNH ₂)	23
4.2	Bensüülkarbasaat (Z-NHNH ₂)	23
4.3	tert-butüül 4-metüülfenüülkarbonaat (O-Boc-p-kresool)	24
4.4	4-(tert-butüüloksükarbonüüloksü)bensüülbromiid	24
4.5	Kaitstud hüdrasiinide bensüülimine	25
4.6	Kaitstud hüdrasiinide alküülimine halogenoetaanhappe estritega	26
5.	Kokkuvõte	27
6.	Summary	28
	Tänuavaldus	29
	Kasutatud kirjandus	30
	Lisa	32

Lühendid

ACN	Atsetonitriil
Boc	<i>tert</i> -butüüloksükarbonüül
DiPEA	N,N'-diisopropüületüülamiin
DMAP	4-dimetüülaminopüridiin
DMF	N,N'-dimetüülformamiid
EA	Etüülatsetaat
Fmoc	9 <i>H</i> -fluoreen-9-üülmetüüloksükarbonüül
NBS	N-bromosuktsiinimiid
NMP	N-metüül-2-pürrolidoon
PE	Petrooleeter
Z	Bensüüloksükarbonüül
TEA	Trietüülamiin
TLC	Planaarkromatograafia

1. Sissejuhatus

Asa-peptiidid on leidnud rakendust ravimtööstuses ning peptidomimeetikutena. Headeks ravimkandidaatideks teeb neid võrreldes tavaliste peptiididega oluliselt suurem *in vivo* stabiilsus. Asa-peptiide sünteesitakse asa-aminohappe sisseviimisega peptiidahelasse. Kuna aga vabad asa-aminohapped ei ole stabiilsed, kasutatakse nende asemel sünteesiks vastavaid prekursoreid. Seni on asa-aminohapete prekursoreid sünteesitud mitmeti; kõige olulisemad meetodid on olnud kaitstud hüdrasiinide otsene alküülimine, kaitstud hüdrasiinide redutseeriv alküülimine ning alküülhüdrasiinide kaitsmine. Igal meetodil on olemas omad puudused, mille tõttu uuringud selles valdkonnas on olulised.

Selle töö eesmärgiks on optimeerida otsese alküülimise meetodit kasutades kaaliumjodiidi katalüüsi. See võimaldab tekitada *in situ* tingimustes oluliselt reaktsioonivõimelisemaid alküüljodiide vähem reaktiivsetest ja paremini säilitatavatest alküülkloriididest või alküülbromiididest.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Ajalooline tähtsus, omadused ja rakendused

Hüdrasiin on tavatingimustes väga reaktsioonivõimeline ja toksiline vedelik. Tema struktuuri võib kirjeldada kui diamiini ning teda teeb huvitavaks tema N-N side; hüdrasiinil on neli võimaliku asenduskohta ja kaks nukleofilset tsentrit (**Skeem 1**). Hüdrasiin võib käituda kui tugev redutseerija ning reaktsiooni saadustena tekib tavaliselt vesi ja lämmastik (Rothgery, 1995). Tema aluselisus esimeses astmes on võrreldav ammoniaagiga, kuid on sellest mõnevõrra madalam ($pK_{a1}(\text{NH}_2\text{NH}_2) = 8.1$, $pK_a(\text{NH}_3) = 8.7$), teise prootoni aga võtab hüdrasiin külge alles väga happelistes tingimustes ($pK_{a2} = -2.9$) (Handbook of Chemistry and Physics, 2001).

Hüdrasiin ja tema lihtsamad orgaanilised derivaadid leidsid väärtuslikku rakendust tehnikas. Näiteks kasutatakse asendamata veevaba hüdrasiini ning tema metüül ja dimetüül derivaate tänu kõrgele põlemissoojusele raketikütusena. Hüdrasiini tugevaid redutseerivaid omadusi kasutatakse ka metalli oksiidide redutseerimiseks, korrosiooni pidurdamiseks, vaba hapniku sidumiseks (Rothgery, 1995).

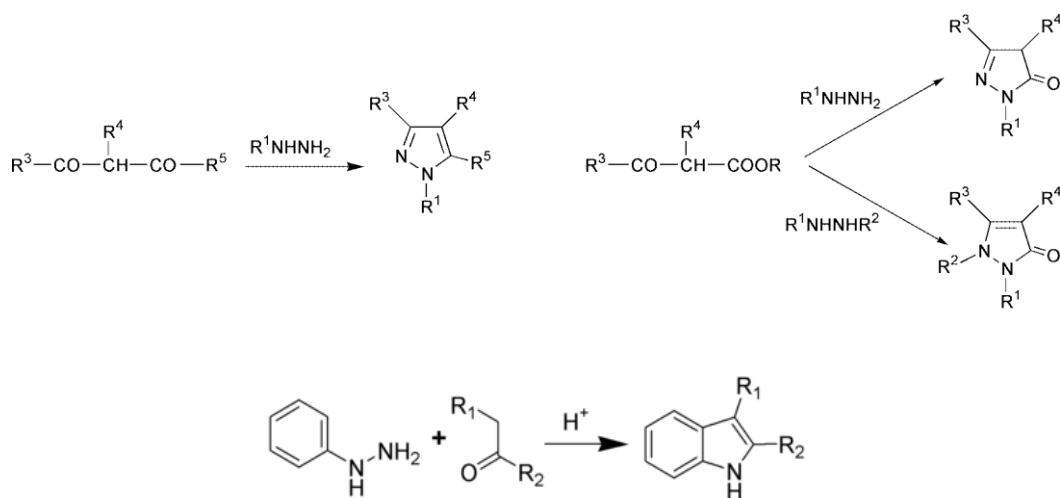


Skeem 1. Hüdrasiini üldstruktuur. R = alküül, arüül, atsüül või H.

Esimest asendatud hüdrasiini, milleks oli fenüülhüdrasiin, sünteesis ja kirjeldas saksa keemik Emil Fischer (Ragnarsson, 2001). Tema esimene sünteesi meetod põhines arüülamiinide diasoteerimisel ja järgneval redutseerimisel. Teine oluline meetod oli asendatud amiinide nitrosoteerimine ja sellele järgnev redutseerimine, kuid nitrosamiinide kantserogeensuse tõttu võib meetodi rakendamine olla ohtlik (Ragnarsson, 2001).

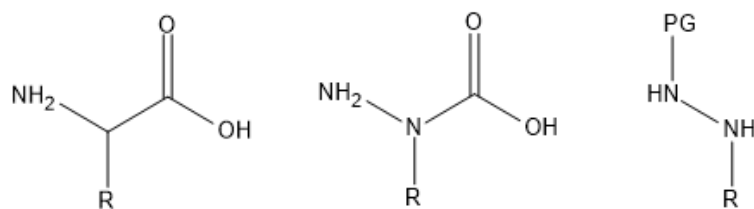
Lisaks rakendustele tehnikas on asendatud hüdrasiinid hinnatud lähteained orgaanilises sünteesis. Nii, näiteks, kasutatakse neid laialdaselt heterotsükliiliste ühendite, taimekaitsevahendite ja paljude füsioloogiliselt aktiivsete ühendite sünteesil (Ragnarsson, 2001). Heaks näiteks hüdrasiini rakendusest heterotsükliiliste ühendite sünteesis on hüdrasiini

reaktsioon 1,3-difunktsionaalsete ühenditega (nt. 1,3-diketoonidega), mille tulemuseks moodustub pürasool, hüdrasiini asendajate varieerimisel saab valmistada erinevaid N-asendatud pürasooli (**Skeem 2**) (Ragnarsson, 2001). Samuti on võimalik valmistada indoole lähtudes fenüülhüdrasiinist ja karbonüülühenditest saadud hüdrasoonidest erinevate Brönstedi või Lewise hapete juuresolekul. Varieerides lähteaineid ja nende asendusühmi (fenüülhüdrasiinid ja karbonüülühendid) on võimalik saada suurt hulka asendatud indoole. Tähtis on mainida, et reaktsioon kulgeb üle hüdrasooniga isomeerse eenhüdrasiini ja et reaktsiooni käigus lahkuks fenüülhüdrasiini -NH_2 lämmastik (Ragnarsson, 2001).



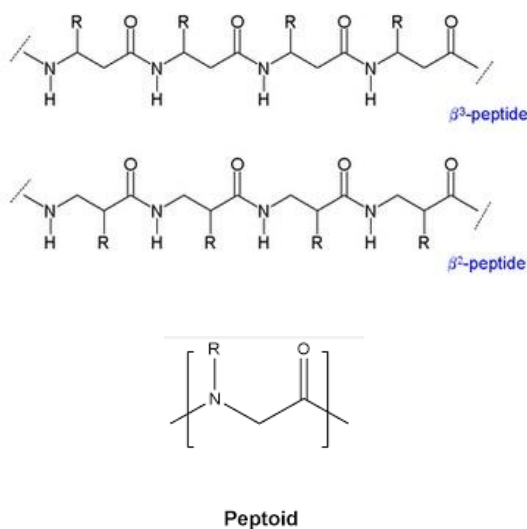
Skeem 2. Lihtsamad näited asendatud hüdrasiinidest heterotsüklite sünteesi kohta (Ragnarsson, 2001).

Lisaks eelnevalt mainitud rakendustele tehnikas ja heterotsükliliste ühendite sünteesil on asendatud hüdrasiinid ka väärtuslikud lähteained modifitseeritud peptiidide valmistamisel. Peptiidid (sh polüpeptiidid) omavad tihti olulist bioaktiivsust, nagu näiteks hormoonid (insuliin, kasvuhormoon jne), neuropeptiidid (endorfiinid, enkefaliin) jt (Jakubke, 1985). Selle tõttu võiksid nad olla olulised ravimtootuses. Kuid tavaline peptiidside on elusorganismile hästi tuttav ja seetõttu lagundatakse see organismis kergesti (proteolüüs). See aga tähendab, et ravimi eluiga *in vivo* võib olla üsna lühike. Asa-peptiidid on sellised peptiidid, kus vähemalt ühe aminohappe α -süsinik on asendatud lämmastikuga (**Skeem 3**). Tähtis on mainida, et vabad asa-aminohapped ei ole stabiilsed ning selle tõttu asa-peptiidide sünteesis kasutatakse nende prekursoreid, milleks on N-kaitstud alküülhüdrasiinid.



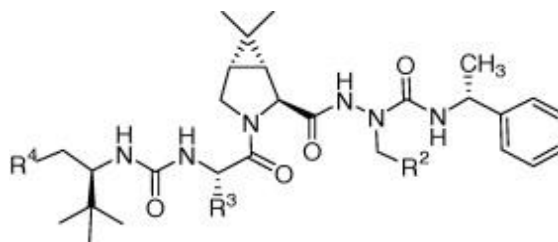
Skeem 3. α -aminohape, asa-aminohape ja sellele vastav prekursor. PG on kaitserühm.

Selline asendus muudab peptiidi struktuuri, aga ka tema keemilisi omadusi, mis tihti tähendab saadava peptiidi tugevamat vastupanu proteolüüsile ja pikemat eluiga *in vivo* (Bondebjerg, 2005). Lisaks sellele on võimalik tõsta peptiidide vastupidavust proteaasidele kasutades aminohapete L-isomeeride asemel D-isomeere, N-asendatud glütsiine (vastavat polümeeri nimetatakse peptoidiks) või α -aminohapete asemel β -aminohappeid (**Skeem 4**) (Miller, 1995).



Skeem 4. β -aminohapetest koosnevate peptiidide ning peptoidi üldstruktuurid.

Ka asa-peptiidid omavad bioloogilist aktiivsust ning nende väljatöötamine on olnud oluline võitlemisel mitmete ohtlike haigustega nagu hepatiit C ja HIV (**Skeem 5**).

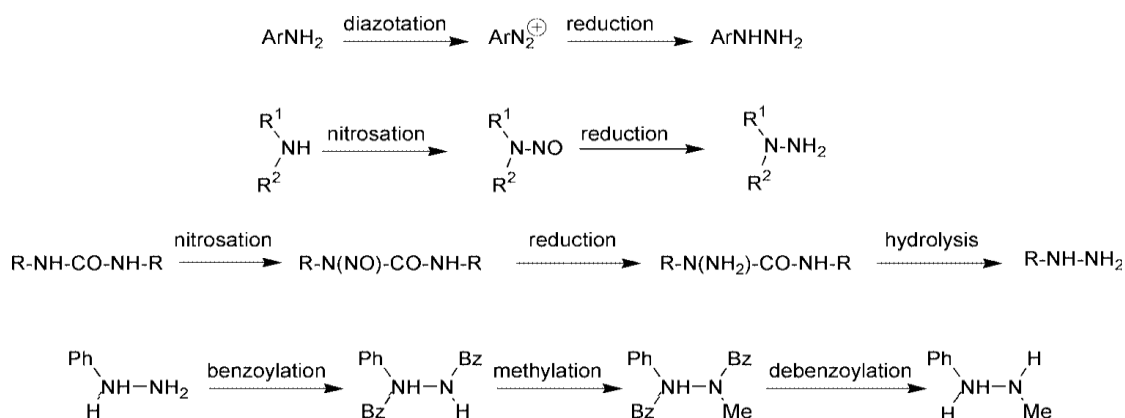


Skeem 5. Hepatiidi C viiruse proteaasi inhibeeriv asa-peptidomimeetik (Venkatraman, 2009).

2.2 Peamised sünteesimeetodid

Tänu oma vabadele elektronpaaridele käitub hüdrasiin nukleofiilina. Naaber lämmastiku aatomi vaba elektronpaar teeb selle nukleofiilse tsentri veelgi tugevamaks vastastikuse tõukumise tõttu, mis on tuntud *alpha*-efekti nime all (Edwards, 1962). Asendatud hüdrasiinide sünteesil tuleb tähelepanu pöörata protsessi selektiivsusele, kuna molekulis on kaks reaktsioonitsentrit. Seetõttu tihti kasutatakse ühe lämmastiku kaitsmist alkoksükarbonüüloksi- või atsüülrühmaga muutmaks tema käitumist erinevaks teisest lämmastikust.

Asendatud hüdrasiine saab sünteesida väga mitmeti. Ajalooliselt on olnud tähtsad diasoteerimine, nitrosoteerimine ning järgnev redutseerimine (**Skeem 6**). Lisaks sellele kasutatakse ka alküülamiinide amineerimist klooramiiniga, amineerimist hüdroksüülamiin-O-sulfoonhappega karbonüülühendi juuresolekul, asendatud karbamiidist hüpokloriti abil (Ragnarsson, 2001).



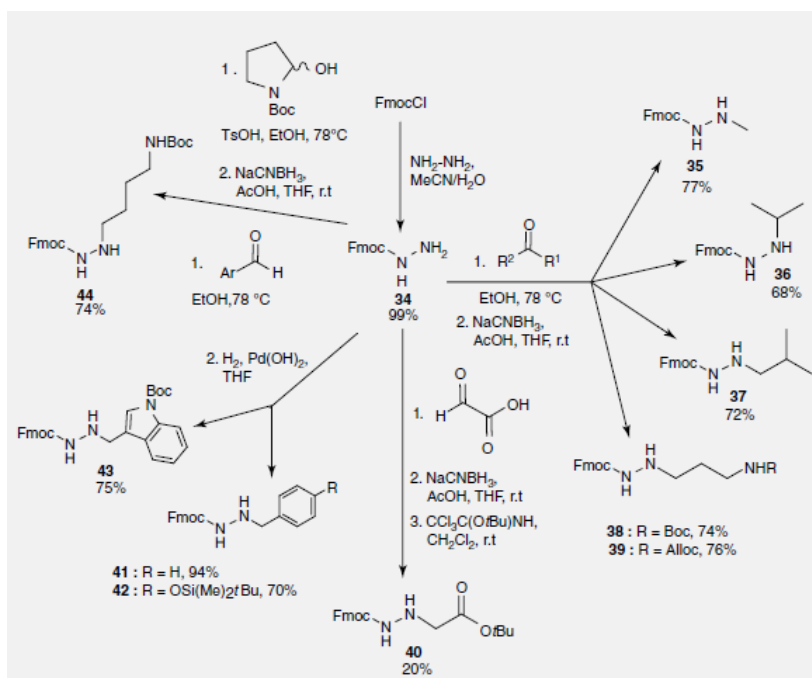
Skeem 6. Neli asendatud hüdrasiinide sünteesi meetodit, mille töötas välja Emil Fischer (Ragnarsson, 2009).

Esimesed kaks meetodit, mis on toodud **Skeemil 6**, põhinevad uue N-N sideme loomisel, reageerides aromaatsse või alifaatsse amiini *in situ* tekitatud nitrosoonium iooniga ning järgneval redutseerimisel. Neljas meetod aga kasutab bensoüül kaitserühmi 1,2-diasendatud hüdrasiini sünteesiks.

Kõige levinumad meetodid asa-aminohapete prekursorite ja muude sarnaste hüdrasiini derivaatide sünteesiks on kaitstud hüdrasiinide otsene alküülimine või redutseeriv alküülimine. Mitmeid alküülhüdrasiine on võimalik aga osta, mistõttu oluline on nende modifitseerimine kaitserühmadega. Kõiki neid reaktsioone vaadeldakse edasi detailsemalt.

2.2.1 Redutseeriv alküülimine

Hüdrasiinid kondenseeruvad karbonüülühenditega moodustades hüdrasoone e vastavaid Schiff'i aluseid. Järgneval redutseerimisel saadakse asendatud hüdrasiin. Nii selektiivsuse tagamiseks kui ka N-N sideme stabiliseerimiseks redutseerimisel on vaja lähteaineks kasutada kaitstud hüdrasiini. Redutseerida saab katalüütiliselt vesinikuga, aga sobivad ka NaBH_4 , NaBH_3CN , $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (**Skeem 7**). Antud meetod on hea selektiivsusega monoalküülimiseks, sest teine kondensatsioon samal tsentril on raskendatud, kuna tekkiv Schiff'i alus on ioonne (Ragnarsson, 2001).

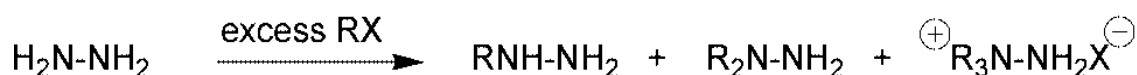


Skeem 7. Fmoc-kaitsstud asa-aminohapete prekursorite sünteesirajad lähtudes Fmoc-hüdrasiinist ja vastavast karbonüülühendist (Proulx, 2011).

Sellel meetodil on mitu puudust. Esiteks, reaktsioon on kaheetapiline. Teiseks, elektronefitsiitsete (aromaatsete ehk Trp, Phe, Tyr prekursorite) hüdrasoonide redutseerimine vajab karmimaid tingimusi, nagu näiteks hüdrogeenimine kõrge rõhu all gaasilise vesinikuga Pd/C juuresolekul. See reaktsioon vajab kalleid katalüsaatoreid, keerulist süsteemi hüdrogeenimiseks ja sellel on suhteliselt madal selektiivsus (Mastitski, 2015).

2.2.2 Otsene hüdrasiinide alküülimine

Nagu teisigi amiine saab hüdrasiini alküülida alküülhalogeniididega. Sellise reaktsiooni puhul, eriti juhul kui asendaja ei ole väga suur, on asendatuse astet raske reguleerida, kuna alküülimisel tekkiv N-alküül tsenter on tugevam nukleofiil kui reaktsiooni lähteaine. Sellest tulenevalt toimub asendus peamiselt ainult ühel tsentril (**Skeem 8**) (Ragnarsson, 2001).



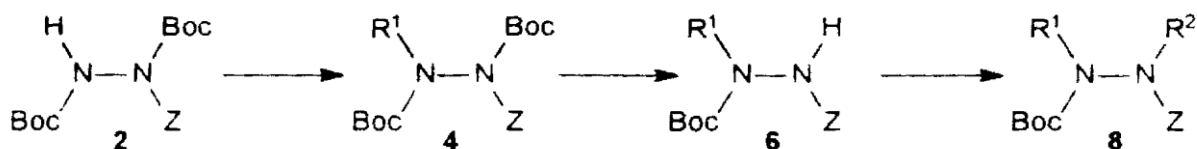
Skeem 8. Hüdrasiini alküülimine RX'ga (kus R = alküül, X = Cl, Br, I)

Probleemist on võimalik üle saada kasutades hüdrasiini suurt ülehulka reaktsioonisegus ja lisades alküülivat reagenti aeglaselt. Oluline on ka aluse ja solvendi valik. Aluse kasutamine tõstab monoalküülitud produkti osakaalu, samas tuleb arvestada kaitserühmade stabiilsust aluste suhtes. Boc- ja Z- rühmade jaoks sobivad tertsiaarsed amiinid (TEA, DiPEA) väga hästi isegi kõrgematel temperatuuridel, kuid aluse suhtes tundlik Fmoc-kaitserühm vajab nõrgemat alust nagu püridiin või tema derivaadid (Mastitski, 2015). Solvendi valik sõltub reaktsiooni iseloomust: S_N1 puhul on paremad polaarsed protoonsed lahustid nagu alkoholid, S_N2 puhul aga polaarsed mitteprotoonsed nagu DMF, ACN, NMP. Siinkohal tuleb silmas pidada, et DMF võib hüdrasiini formüleerida (Mastitski, 2014).

Asa-aminohapete prekursoreid on võimalik saada otsese alküülimise teel. Selleks kaitstakse üks lämmastik kaitserühmaga (näiteks Boc-, Z- või Fmoc-) ning viiakse alküülimine läbi arvestades eelöeldud otsese alküülimise aspekte ja raskusi.

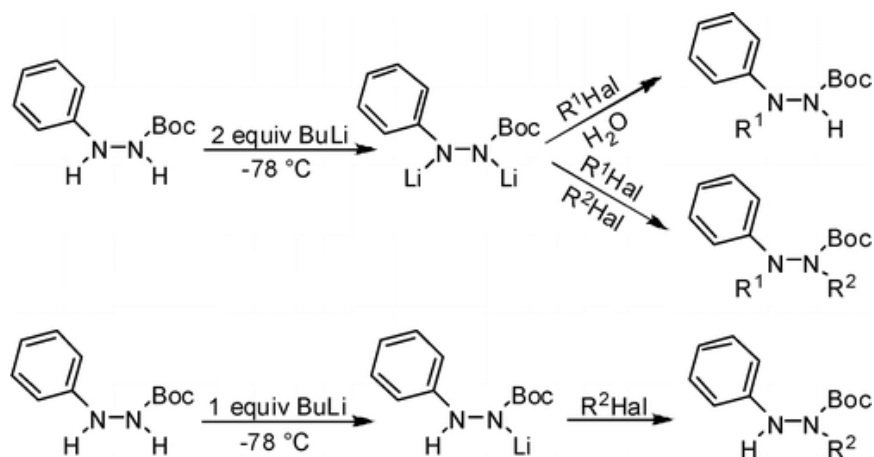
Di-, tri- või tetra- asendatud hüdrasiine on võimalik saada sama meetodiga, kasutades ortogonaalseid kaitserühmi. Siin tuleb silmas pidada asjaolu, et ka sama tüüpi kaitserühmad

võivad olla omavahel ortogonaalsed juhul kui lämmastik, millega üks neist on seotud, on seotud veel mõne teise kaitserühmaga. Näiteks NH-grupi küljes olev Boc erineb NZ- küljes olevast Boc'ist, mis tähendab seda, et neid saab selektiivselt maha võtta (**Skeem 9**) (Mäeorg, 1999).



Skeem 9. Kaitstud hüdrasiini regioselektiivne alküülimine. Ühend **8** omab kahte omavahel ortogonaalset rühma, mis tähendab seda, et temaga on võimalik läbi viia edasist alküülimist saamaks hüdrasiini nelja asendajaga (Mäeorg, 1999).

Lisaks sellele on võimalik regioselektiivselt alküülida kaitstud hüdrasiine kasutades ära lämmastiktsentrite erinevaid N-H happelisusi. Vaba -NH_2 on palju tugevam nukleofiil kui atsüül-NH, kuid samal põhjusel on atsüül-NH oluliselt happelisem ja deprotoneerub pehmemates tingimustes kui -NH_2 , mille tulemusena tekib väga nukleofiilne anioon. Sellise meetodiga võib minna edasi ja kasutada ära deprotoneerumisel tekkivate N^- anioonide teineteisest erinevaid nukleofiilsusi regioselektiivseks alküülimiseks (**Skeem 10**) (Mäeorg, 2007).



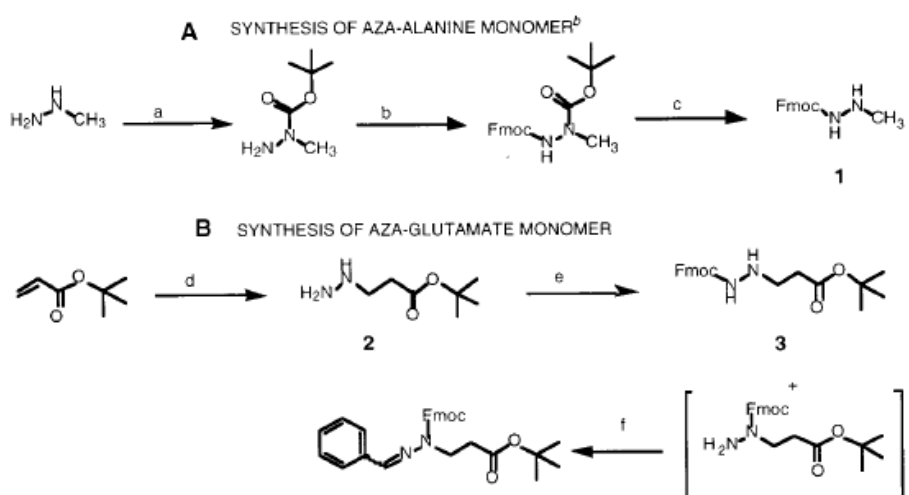
Skeem 10. Kaitstud fenüülhüdrasiini alküülimine kasutades BuLi (Mäeorg, 2007).

Nagu eelnevalt sai öeldud, võib aromaatsete asa-aminohapete prekursorite saamine redutseeriva alküülimise teel osutuda keeruliseks, mille tõttu on üritatud optimeerida

vastavate ainete saamist ka otsese alküülamise teel. Kaitstud hüdrasiini 3-kordse ülehulga ja sobiva aluse ning lahusti kasutamisel on võimalik saada monoalküülitud produkti üsna hea saagisega. See võimaldab teostada reaktsiooni ühes etapis, kiiresti ja katalüsaatoreid kasutamata. Alküülhalogeniididest kõige paremini reageerivad vastavad jodiidid, bromiidid andsid häid tulemusi ning kloriididega reaktsioon läks üsna halvasti. Samas tuleb märkida, et alküüljodiidide kasutamine on keerulisem võrreldes teiste halogeniididega, kuna säilitamisel nad kipuvad lagunema ning nende käitlemine on samuti raskendatud nende kõrge reaktsioonivõime tõttu (Mastitski, 2015). Reageerimata jäänud kaitstud hüdrasiini võib pärast kromatograafiliselt eraldada ja taaskasutada.

2.2.3 Alküülhüdrasiinide kaitsmine

Asa-aminopeptiidide prekursorid, mis on N-kaitstud alküülhüdrasiinid, on võimalik saada ka kaubanduslikult saadavatest alküülhüdrasiinidest nende kaitsmise teel (**Skeem 11**).

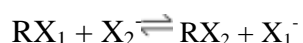


Skeem 11. Asa-alaniini ja asa-glutamiinhappe prekursorite süntees vastavate alküülhüdrasiinide kaitsmise teel. Reaktsioonitingimused: a. Boc_2O , THF, -70°C ; b. Fmoc-OSu, metanool; c. 50% TFA/DCM; d. hüdrasiin, isopropanool, 10 min; e. Fmoc-OSu, metanool; f. bensaldehüüd, toluen, 70°C . (Hart, 2001)

2.3 Finkelsteini reaktsioon

Finkelsteini reaktsiooniks nimetatakse $\text{S}_{\text{N}}2$ reaktsiooni, kus üks halogeniid asendab teist halogeniidi orgaanilises ühendis. Reaktsioon on põhimõtteliselt tasakaaluline, kuid tasakaalu saab nihutada saaduste poole kasutades ära erinevate halogeniidide erinevat

lahustuvust kasutatavas lahustis (**Skeem 12**) (Smith, 2007). Selle reaktsiooni eesmärk seisneb tihti selles, et tekitada reaktsioonivõimelisem alküülhalogeniid reaktsioonikeskkonnas. Kõige reaktsioonivõimelisemad on alküüljodiidid, kuid samas ei ole nad tihti piisavalt stabiilsed ning nende säilitamine on raskendatud. Sellest lähtudes rakendatakse *in situ* alküüljodiidide tekitamist teistest alküülhalogeniididest (nt. kloriididest või bromiididest). Näiteks on proovitud N-asendatud aniliine alküülida KI juuresolekul kõrgematel temperatuuridel (110 °C) atsetonitriilis mikrolainekiirguse abil (Romera, 2004). Käesolevas töös kasutati samuti KI head ning KCl/KBr halba lahustuvust atsetonitriilis.



Skeem 12. Alküülhalogeniidi ja teise halogeniidi aniooni vaheline S_N2 reaktsioon.

Reaktsioon on tasakaaluline, kuid tasakaalu saab nihutada saaduste poole kasutades lahustit, kus MX₁ (M = Na, K) praktiliselt ei lahustu. Klassikaliselt kasutatakse selleks atsetooni, milles NaI lahustub hästi, kuid NaCl ja NaBr peaaegu ei lahustu (Finkelstein, 1910).

Kaugeltki mitte kõik alküülhalogeniidid pole kasutatavad antud reaktsioonis. Mitte-konjugeeritud süsteemidest kõige paremini reageerivad primaarsed (v.a neopentüül) halogeniidid, sekundaarsed halogeniidid reageerivad oluliselt halvemini ning tertsiaarsed praktiliselt ei reageeri. Allüülsed, bensüülsed ja α-karbonüülsed halogeniidid, tõenäoliselt tänu konjugatsioonist tingitud vaheühendi stabilisatsioonile, reageerivad märgatavalt paremini kui lihtsalt alküülhalogeniidid. Samas vinüülsed ja arüülsed halogeniidid ei reageeri (Streitwieser, 1956).

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Kasutatud aparatuur

* TMR spektreid mõõdeti 200 või 700 MHz spektromeetril (Bruker), solvendina kasutati CDCl_3 ning sisestandardiks solvent või TMS.

*TLC Merck Silica gel 60 F254.

* Merck Silica gel 60-230 (0,063-0,2 mm) ainete kromatograafiliseks lahutamiseks.

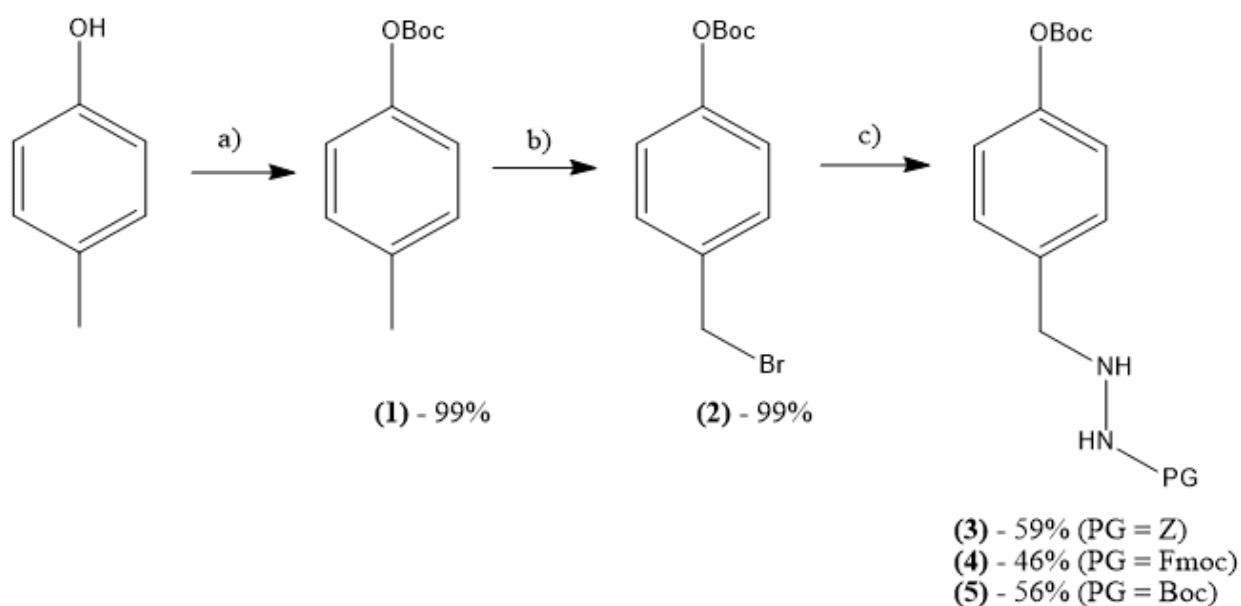
3.2 Kasutatud reaktiivide ja solventide füüsikalised omadused [19]

Aine nimetus	M (g/mol)	Kt ($^{\circ}\text{C}$)	St ($^{\circ}\text{C}$)	Tihedus (g/cm^3)	n_D^{20}
ACN	41,05	81-82	-45	0,786	1,344
DCM	84,93	40	-97	1,327	1,424
EA	88,11	77	-84	0,902	1,372
CCl_4	153,81	76,72	-22,92	1,587	1,461
p-kresool	108,13	201,8	35,5	1,035	1,540
KI	166,00	1330	681	3,123	1,677
DiPEA	101,19	83-85	-61	0,722	1,392
2,4,6-trimetüülpüridiin	121,18	171-172	-43	0,917	1,498
$\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50,06	120	-52	1,032	1,428
PE	-	40-60		0,65	1,369
Fmoc-Cl	258,70	-	62-64		
Z-Cl	170,59	laguneb		1,195	1,519
Bn-Cl	126,58	179	-39	1,100	1,542
tert-butüülbromoatsetaat	195,05	50 (10 mm/Hg)	-	1,321	1,445
etüüükloroatsetaat	122,55	143	-26	1,145	1,421
p-metoksübensüüükloriid	156,61	117-118	-1	1,115	1,548
Boc-NHNH ₂	132,16	63-65	39-42	1,02	1,449
vv. Na_2SO_4	142,04	1429	884	2,664	1,468

Boc ₂ O	218,25	56-57 (0.5 mm/Hg)	22-24	0,95	1,409
bensoüülperoksiid	242,23	-	103-105, laguneb	1,334	1,543
DMAP	122,17	195	110-113	0,41	-
NBS	177,99	339	175-178	2,098	-

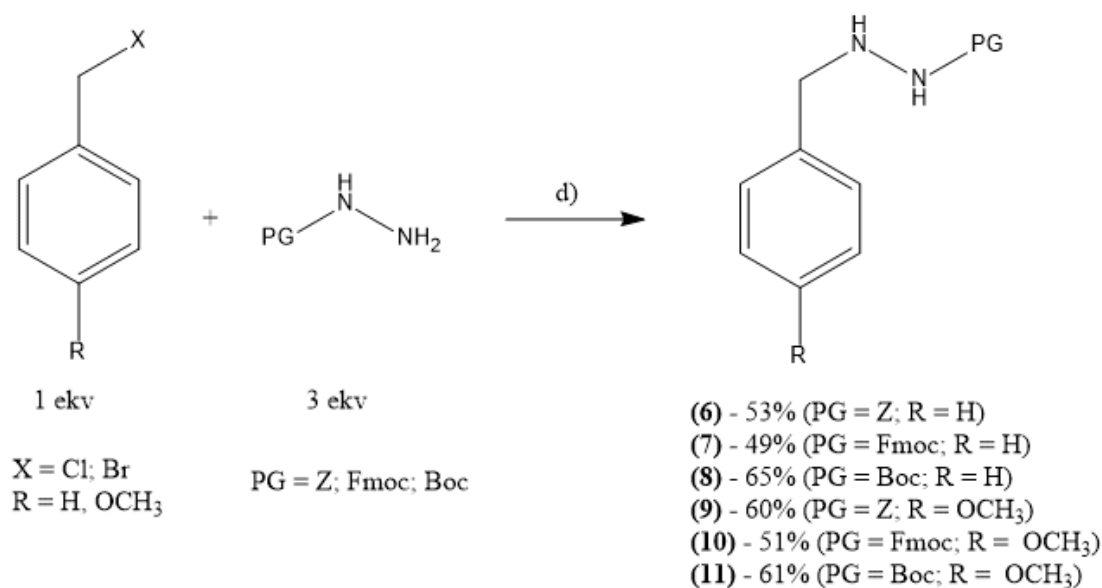
3.3 Sünteesiskeemid

3.3.1 N-(Fmoc-; Boc-; Z-) kaitstud asa-türosiini prekursorite süntees



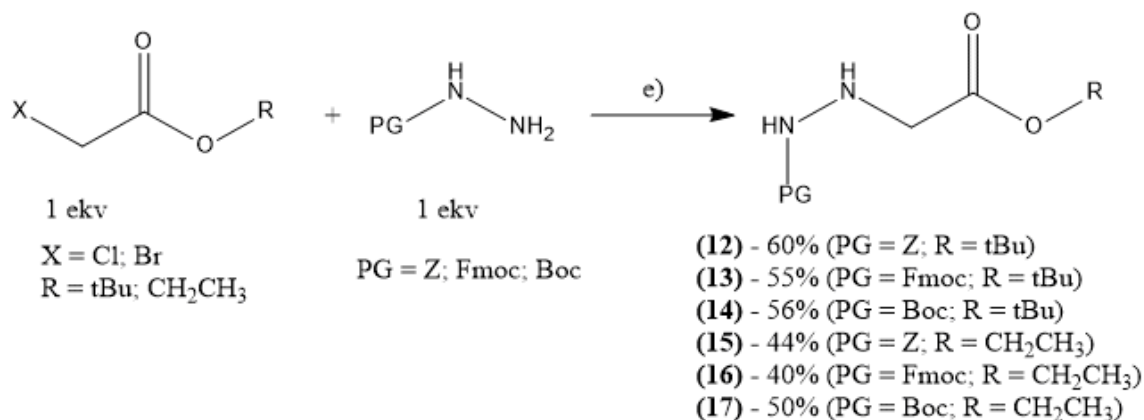
Skeem 13. Reaktsioonitingimused: a) CHCl₃, 1.05 ekv Boc₂O, 0.1 ekv DMAP; b) CCl₄, 1.05 ekv NBS, kat. BzOOBz; c) 3 ekv PGNHNH₂ (0.1M lahus ACN-s), 1.5 ekv DiPEA (Z- ja Boc-) või 2,4,6-trimetüülpüridiini (Fmoc-), 0.1 ekv KI.

3.3.2 KI poolt katalüüsitud kaitstud hüdrasiinide bensüülimine



Skeem 14. Reaktsioonitingimused: d) 3 ekv PGNHNH₂(0.1 M lahuses ACN-s), 1.5 ekv DiPEA (Z- ja Boc-) või 2,4,6-trimetüülpüridiini (Fmoc-), 0.1 ekv KI.

3.3.3 KI poolt katalüüsitud kaitstud hüdrasiinide alküülimine halogenoetaanhappe estritega



Skeem 15. Reaktsioonitingimused: e) 1 ekv PGNHNH₂ (0.1 M lahuses ACN-s), 1.5 ekv DiPEA (Z- ja Boc-) või 2,4,6-trimetüülpüridiini (Fmoc-), 0.1 ekv KI.

3.4 Üldised sünteesi meetodid ja sünteesitud ainete iseloomustused

3.4.1 9H-fluoreen-9-üülmetüülkarbasaat (Fmoc-NHNH₂)

Viide: (Boeglin, 2005)

Aluseks oli võetud (Boeglin 2005) protseduur. Lühidalt: 80 % N₂H₄•H₂O (16 ekv, 10 ml) lahustatakse 20 ml ACN:H₂O 1:1 segus. Kolb täidetakse Ar-ga. Saadud segu jahutatakse maha 0°C-ni jäävannil ja intensiivselt segades lisatakse tilkhaaval tilklehtrist Fmoc-Cl (1 ekv, 4 g, 15.5 mmol) lahust 250 ml ACN-s 2 t jooksul. Segatakse toatemperatuuril veel 2 t. Lahusti roteeritakse kokku ning tahke jääk kantakse filtrile, pestakse 3x külma veega ja 3x PE. Seejärel kuivatatakse ja vakumeeritakse lahustite jääkidest. Produkt on valge tahkis (3.7 g, 89%).

TMR (200 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 3.76 (s, 2H, NH₂); 4.23 (s, 1H, CH); 4.45 (d, 2H, J = 5.6 Hz, CH₂); 6.04 (s, 1H, NH); 7.30-7.77 (m, 8H, Ar(H)). ¹³C δ = 47.2; 67.3; 120.1; 125.0; 127.1; 127.8; 141.4; 143.7; 158.2.

3.4.2 Bensüülkarbasaat (Z-NHNH₂)

Viide: (Jurmann, 2005)

80 % N₂H₄•H₂O (11 ekv, 20 ml) lahustatakse 100 ml ACN-s, kolb täidetakse Ar-ga ning saadud segu jahutatakse maha jäävannil. Seejärel lisatakse intensiivselt segades tilkhaaval Z-Cl (1 ekv, 8.36 g, 49 mmol) lahust 10 ml ACN-s. Pärast kogu Z-Cl lahuse lisamist segatakse veel 30 min jäävannil ja 2 t toatemperatuuril. Segu jäetakse järgmise päevani külmikusse. ACN roteeritakse ning lahustatakse kolbi jäänud aine EA-s. Orgaaniline faas ekstraheeritakse 3x veega, 1x küll. NaCl lahusega. Saadud veefaas ekstraheeritakse 4x EA, saadud orgaaniline faas kuivatatakse 1x küll. NaCl. Orgaanilised faasid ühendatakse, kuivatatakse vv. Na₂SO₄-ga, filtreeritakse ja EA roteeritakse kokku. Aine puhastatakse kolonnkromatograafiliselt kasutades eluendiks EA. Saadakse valge tahke aine (saagis 85%).

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 3.76 (s, 2H, NH₂); 5.14 (s, 2H, CH₂); 6.03 (s, 1H, NH); 7.33-7.36 (m, 5H, Ar(H)). ¹³C δ = 67.5; 128.4; 128.5; 128.8; 136.2; 158.8.

3.4.3 *tert*-butüül 4-metüülfenüülkarbonaat (*O*-Boc-*p*-kresool)

Viide: (McKay, 1957)

p-Kresool (1 ekv, 1 g, 9.26 mmol) lahustatakse 10 ml kloroformis, lahusele lisatakse Boc_2O (1.05 ekv, 2.2 g) ja seejärel DMAP (0.1 ekv, 0.1 g). Reaktsiooni kulgemist jälgitakse TLC (eluent EA/PE 1:4) abil, 50 min pärast on lähteaine laik kadunud. Lahusti roteeritakse kokku, jääk lahustatakse 150 ml EA ning ekstraheeritakse 1x 0.2 M KHSO_4 , 1x veega, 1x küll NaHCO_3 , 1x veega, 1x küll. NaCl. Orgaaniline faas kuivatatakse vv Na_2SO_4 , roteeritakse kokku ja vakumeeritakse. Saadakse läbipaistev kergelt kollakas viskoosne vedelik, mis aja möödudes toatemperatuuril kristallub. Produkt (1.93 g, 99%) on TLC järgi puhas.

TMR (200 MHz; CDCl_3): ^1H δ = 1.54 (s, 9H, 3x CH_3); 2.53 (s, 3H, CH_3); 7.03 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar(H)); 7.15 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar(H)). ^{13}C δ = 20.8; 27.7; 83.2; 121.0; 129.8; 135.3; 149.1; 152.1.

3.4.4 4-(*tert*-butüüloksiükarbonüüloksiü)bensüülbromiid

Valmistatakse *O*-Boc-*p*-kresooli (1 ekv, 500 mg, 2.4 mmol), NBS (1.05 ekv, 450 mg) lahus CCl_4 -s koguruumalaga 20 ml. Reaktsiooni initsieerimiseks lisatakse spaatliotsast terake dibensoüülperoksiidi ning segu keedetakse püstjahutiga. Reaktsiooni jälgitakse TLC (eluent EA/PE 1:10) abil, 2 t pärast on reaktsioon praktiliselt lõpuni jõudnud. Suktsiinimiid sadeneb reaktsioonisegust valge sademena. Viimast eemaldatakse filtreerimise teel ning pestakse 3 ml külma CCl_4 -ga. Filtraat roteeritakse kokku, vakumeeritakse lahusti jääkide eemaldamiseks ning saadud kergelt kollaka tahkist (0.685 g, 99%) kasutatakse järgnevatel katsetel.

TMR (200 MHz; CDCl_3): ^1H δ = 1.56 (s, 9H, 3x CH_3); 4.48 (s, 2H, CH_2Br); 7.17 (d, 2H, J = 6.6 Hz, Ar(H)), 7.40 (d, 2H, J = 6.6 Hz, Ar(H)). ^{13}C δ = 27.7; 32.4; 83.7; 121.6; 130.2; 135.3; 151.1; 152.3.

3.4.5 Üldine protseduur kaitstud hüdrasiinidebensüülimiseks

Kaitstud hüdrasiin (3 ekv, 150 mg) lahustatakse ACN-s (lõpplahus 0.1 M), lisatakse alusena DiPEA (1.5 ekv, Boc- ja Z- NHNH_2 korral) või 2,4,6-trimetüülpüridiini (1.5 ekv, Fmoc- NHNH_2 korral) ning katalüütiline kogus (0.1 ekv) KI. Segu kuumutatakse keemiseni ning lisatakse tilkhaaval alküüliva reagendi (1 ekv) lahust ACN-s. Segu keedetakse

püstjahutiga umbes 6 t, reaktsiooni jälgitakse TLC abil (eluendiks EA/PE 1:2 või 1:1). Kui reaktsioon on lõppenud, ACN roteeritakse ning segu vakumeeritakse lahusti jääkide eemaldamiseks. Edasi lisatakse segule küll. NaHCO₃ ja kokku 100 ml EA, kantakse kvantitatiivselt jaotuslehtrisse ja ekstraheeritakse veel 2x veega, 1x küll NaCl. Veefaas ekstraheeritakse 2x EA, saadud orgaanilised faasid ühendatakse ning pestakse küll. NaCl, seejärel ühendatakse see esimese orgaanilise faasiga ning kuivatatakse vv. Na₂SO₄-ga. Sool filtreeritakse ning lahus roteeritakse ja vakumeeritakse. Saadud segu puhastatakse kolonnkromatograafiliselt eluendiga EA/PE 1:2 või 1:1.

(3) *N*-(bensüüloksükarbonüül)-*N'*-(4-tertbutüüloksükarbonüül)bensüül hüdrasiin:

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.55 (s, 9H, 3xCH₃); 3.99 (s, 2H, CH₂); 4.27 (br s, 1H, NH); 5.13 (s, 2H, CH₂(Z)); 6.38 (br s, 1H, NH); 7.11 (d, 2H, J = 7.7 Hz, Ar(H)); 7.31-7.35 (m, 7H, Ar(H)). ¹³C δ = 27.7; 54.9; 67.1; 83.6; 121.3; 128.2; 128.3; 128.6; 129.9; 135.0; 136.0; 150.5; 151.9; 157.2. Saagis: 46% (KI, 5 t)

(4) *N*-(fluoreen-9-üülmetüüloksükarbonüül)-*N'*-(4-tertbutüüloksükarbonüül)bensüül

hüdrasiin: TMR (200 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.56 (s, 9H, 3xCH₃); 3.61 (br s, 1H, NH); 3.96 (s, 2H, CH₂); 4.21 (t, 1H, J = 6.4 Hz, CH(Fmoc)); 4.44 (d, 2H, J = 6.6 Hz, CH₂(Fmoc)); 6.36 (br s, 1H, NH); 7.12 (d, 2H, J = 8.4 Hz, 2H, Ar(H)); 7.24-7.42 (m, 6H, Ar(H)); 7.56 (d, 2H, J = 7.2 Hz, Ar(H)); 7.75 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Ar(H)). ¹³C δ = 27.7; 47.3; 55.0; 67.0; 83.5; 120.0; 121.3; 125.0; 127.1; 127.8; 129.9; 135.0; 141.4; 143.7; 150.6; 151.9; 157.2. Saagis: 56% (KI, 5 t)

(5) *N*-(tert-butüüloksükarbonüül)-*N'*-(4-tertbutüüloksükarbonüül)bensüül hüdrasiin:

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.46 (s, 9H, 3xCH₃(NBoc)); 1.56 (s, 9H, 3xCH₃(OBoc)); 3.98 (s, 2H, CH₂); 4.22 (br s, 1H, NH); 6.08 (br s, 1H, NH); 7.13 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar(H)); 7.35 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar(H)). ¹³C δ = 27.8; 28.6; 55.0; 80.5; 83.5; 121.3; 130.0; 135.3; 150.4; 151.9; 156.7. Saagis: 59% (KI, 5 t)

(6) *N*-(bensüüloksükarbonüül)-*N'*-bensüül hüdrasiin (Kiss, 2012):

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 3.86 (br s, 1H, NH); 4.02 (s, 2H, CH₂); 5.14 (s, 2H, CH₂(Z)); 6.31 (br s, 1H, NH); 7.27-7.36 (m, 10H, Ar(H)). ¹³C δ = 55.7; 67.1; 127.6; 128.2; 128.3; 128.5; 128.6; 129.0; 136.0; 137.3; 157.2. Saagised: 53% (KI, 5 t), 21% (ilma KI, 24 t)

(7) *N*-(fluoreen-9-üülmetüüloksükarbonüül)-*N'*-bensüül hüdrasiin (Boeglin, 2005):

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 3.85 (br s, 1H, NH); 4.02 (s, 2H, CH₂); 4.23 (s, 1H, CH(Fmoc)); 4.47 (s, 2H, CH₂(Fmoc)); 6.31 (br s, 1H, NH); 7.31-7.34 (m, 7H, Ar(H)); 7.41 (t, 2H, J = 7.7 Hz, Ar(H)); 7.57 (d, 2H, J = 4.2 Hz, Ar(H)); 7.77 (d, 2H, J = 7.7 Hz, Ar(H))
¹³C δ = 47.3; 55.8; 67.1; 120.2; 125.1; 127.2; 127.7; 127.9; 128.7; 129.1; 137.5; 141.5; 143.8; 157.3. Saagised: 49% (KI, 5 t), 22% (ilma KI, 24 t)

(8) *N*-(tert-butüüloksükarbonüül)-*N'*-bensüül hüdrasiin (Wieczerek, 2002):

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.46 (s, 9H, 3xCH₃); 4.00 (s, 2H, CH₂), 4.47 (br s, 1H, NH); 6.26 (br s, 1H, NH); 7.27-7.35 (m, 5H, Ar(H)). ¹³C δ = 28.3; 55.8; 80.7; 127.6; 128.5; 129.0; 137.3; 156.6. Saagised: 65% (KI, 5 t), 60% (ilma KI, 24 t).

(9) *N*-(bensüüloksükarbonüül)-*N'*-(4-metoksü)bensüül hüdrasiin:

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 3.76 (s, 3H, CH₃); 3.92 (s + br s, 3H, CH₂ + NH); 5.13 (s, 2H, CH₂ (Z)); 6.46 (br s, 1H, NH); 6.83 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ar(H)); 7.22 (d, 2H, J = 8 Hz, Ar(H)); 7.33 (s, 5H, Ar(H)) ¹³C δ = 55.2; 67.1; 114.0; 128.1; 128.3; 128.6; 129.5; 130.2; 136.2; 157.2; 159.2. Saagised: 60% (KI, 6 t), 18% (ilma KI, 24 t)

(10) *N*-(fluoreen-9-üülmetüüloksükarbonüül)-*N'*-(4-metoksü)bensüül hüdrasiin:

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 3.78 (s, 3H, CH₃); 3.95 (s, 2H, CH₂); 4.21 (s, 2H, CH (Fmoc) + NH); 4.45 (s, 2H, CH₂ (Fmoc)); 6.32 (s, 1H, NH); 6.85 (d, 2H, J = 7 Hz, Ar(H)); 7.23 (s, 2H, Ar(H)), 7.30 (t, 2H, J = 7 Hz, Ar(H)), 7.39 (t, 2H, J = 7 Hz, Ar(H)), 7.55 (d, 2H, J = 4.9 Hz, Ar(H)), 7.75 (d, 2H, J = 7.7 Hz, Ar(H)). ¹³C δ = 47.2; 55.0; 55.3; 66.9; 113.9; 120.0; 121.5; 125.0; 127.1; 127.8; 130.3; 141.3; 143.7; 157.2; 159.1. Saagised: 51% (KI, 6 t), 20% (ilma KI, 24 t)

(11) *N*-(tert-butüüloksükarbonüül)-*N'*-(4-metoksü)bensüül hüdrasiin (Wieczerek, 2002):

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.47 (s, 9H, 3xCH₃); 3.80 (s, 3H, OCH₃); 3.92 (s + br s, 3H, CH₂ + NH); 6.13 (s, 1H, NH); 6.86 (d, 2H, J = 9.1 Hz, Ar(H)); 7.27 (d, 2H, J = 7.7 Hz, Ar(H)). ¹³C δ = 28.4; 55.2; 55.3; 80.5; 113.9; 129.6; 130.3; 156.7; 159.0. Saagised: 61% (KI, 6 t), 27% (ilma KI, 24 t)

3.4.6 Üldine protseduur kaitstud hüdrasiinide alküülimiseks halogenoetaanhappe estritega

Kaitstud hüdrasiin (1 ekv, 150 mg) lahustatakse ACN-s (lõpplahus 0.1 M), lisatakse alusena DiPEA (1.5 ekv, Boc- ja Z-NHNH₂ korral) või 2,4,6-trimetüülpüridiini (1.5 ekv, Fmoc-NHNH₂ korral) ning 0.1 ekv KI. Segu kuumutatakse keemiseni ning lisatakse tilkhaaval alküüлива reagenti (1 ekv) lahust ACN-s. Segu keedetakse püstjahutiga umbes 24 t, reaktsiooni jälgitakse TLC (eluendiks EA/PE 1:1 või 2:1) abil. Kui reaktsioon on lõppenud, ACN roteeritakse ning segu vakumeeritakse. Edasi segule lisatakse küll. NaHCO₃ ja kokku 100 ml EA, kantakse kvantitatiivselt jaotuslehtrisse ja ekstraheeritakse veel 2x veega, 1x küll NaCl. Veefaas ekstraheeritakse 2x EA, saadud orgaanilised faasid ühendatakse ning kuivatatakse küll. NaCl, seejärel ühendatakse see esimese orgaanilise faasiga ning kuivatatakse vv. Na₂SO₄-ga. Sool filtreeritakse ning lahus roteeritakse ja vakumeeritakse. Saadud segu puhastatakse kolonnkromatograafiliselt eluendiga EA/PE 1:1 või 2:1.

(12) tert-butüül *N*-(bensüüloksükarbonüül)-*N'*-hüdrasinoatsetaat:

TMR (200 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.46 (s, 9H, 3xCH₃); 3.55 (s, 2H, CH₂); 4.21 (s, 1H, NH); 5.14 (s, 2H, CH₂ (Z)); 6.79 (br s, 1H, NH); 7.32 (q, 1H, J = 4.2 Hz, Ar(H)); 7.36 (d, 4H, J = 4.2 Hz, Ar(H)). ¹³C δ = 28.1; 53.4; 67.1; 80.0; 128.25; 128.30 ; 128.6; 136.0; 157.7; 170.6. Saagis: 60% (KI, 24 t)

(13) tert-butüül *N*-(fluoreen-9-üülmetüüloksükarbonüül)-*N'*-hüdrasinoatsetaat (Boeglin, 2005):

TMR (200 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.47 (s, 9H, 3xCH₃); 3.52 (s, 2H, CH₂); 4.20 (t, 1H, J = 6.4 Hz, CH (Fmoc)); 4.26 (br s, 1H, NH); 4.41 (d, 2H, J = 7 Hz, CH₂(Fmoc)); 6.93 (br s, 1H, NH); 7.24-7.41 (m, 4H, Ar(H)); 7.57 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Ar(H)); 7.73 (d, 2H, J = 7.6 Hz, Ar(H)). ¹³C δ = 28.1; 47.2; 53.4; 67.1; 81.9; 120.0; 125.1; 127.1; 127.7; 141.3; 143.8; 156.8; 170.5. Saagis: 55% (KI, 24 t)

(14) tert-butüül *N*-(tert-butüüloksükarbonüül)-*N'*-hüdrasinoatsetaat:

TMR (200 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.46 (s, 9H, 3xCH₃ (Boc)); 1.47 (s, 9H, 3xCH₃); 3.54 (s, 2H, CH₂); 4.47 (br s, 1H, NH); 6.73 (br s, 1H, NH). ¹³C δ = 28.1; 28.4; 53.5; 80.4; 81.6; 156.3; 170.4. Saagis: 56% (KI, 24 t).

(**15**) etüül *N*-(bensüüloksükarbonüül)-*N'*-hüdrasinoatsetaat (Niedrich, 1965):

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.27 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃); 3.66 (s, 2H, CH₂); 4.20 (q + br s, 3H, J = 7 Hz, NH + CH₂); 5.14 (s, 2H, CH₂(Z)); 6.76 (s, 1H, NH); 7.32-7.36 (m, 5H, Ar(H)). ¹³C δ = 14.2; 52.8; 61.1; 67.2; 128.3; 128.3; 128.6; 136.0; 156.7; 171.2. Saagised: 44% (KI, 24 t), 15% (ilma KI, 24 t).

(**16**) etüül *N*-(fluoreen-9-üülmetüüloksükarbonüül)-*N'*-hüdrasinoatsetaat (Peifer, 2009):

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.29 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃); 3.64 (s, 2H, CH₂); 4.22 (q + br s, 4H, J = 7 Hz, NH + OCH₂ + CH (Fmoc)); 4.44 (d, 2H, J = 5.6 Hz, CH₂(Fmoc)); 6.72 (br s, 1H, NH); 7.30 (t, 2H, J = 7 Hz, Ar(H)); 7.40 (t, 2H, J = 7.7 Hz, Ar(H)); 7.57 (d, 2H, J = 7 Hz, Ar(H)); 7.76 (d, 2H, J = 7 Hz, Ar(H)). ¹³C δ = 14.2; 47.1; 52.7; 61.2; 67.1; 120.0; 125.0; 127.1; 127.8; 141.3; 143.7; 156.7; 171.3. Saagised: 40% (KI, 24 t), 20% (ilma KI, 24 t).

(**17**) etüül *N*-(tert-butüüloksükarbonüül)-*N'*-hüdrasinoatsetaat (Niedrich, 1965):

TMR (700 MHz; CDCl₃): ¹H δ = 1.28 (t, 3H, J = 7 Hz, CH₃); 1.46 (s, 9H, 3xCH₃(Boc)); 3.65 (s, 2H, CH₂); 4.14 (br s, 1H, NH); 4.21 (q, 2H, J = 7.7 Hz, OCH₂); 6.49 (br s, 1H, NH). ¹³C δ = 14.2; 28.3; 52.9; 61.0; 80.6; 156.2; 171.2. Saagis: 50% (KI, 24 t).

4. Tulemused ja nende arutelu

4.1 9H-fluoreen-9-üülmetüülkarbasaat (Fmoc-NHNH₂)

Selle sünteesireaktsiooni läbiviimisel kasutati hüdrasiini suurt ülehulka vältimaks *N*, *N'*-diatsüül produkti tekkimist. Lisaks sellele käitub hüdrasiin reaktsioonisegus alusena, sidudes atsüülimise reaktsioonis tekkiva vesinikkloriidi. Reaktsioon viidi läbi argooni atmosfääris, et vältida kõrvalreaktsioone nagu hüdrasiini oksüdeerumine. Intensiivne segamine ning tilkahaaval Fmoc-Cl lisamine aitas viia miinimumini lokaliseeritud kõrge Fmoc-Cl kontsentratsiooni esinemise võimaluse, mis soodustaks diatsüülitud produkti tekkimist. Reaktsioon on eksotermiline ning kõrgemal temperatuuril jällegi diatsüülimise tõenäosus kasvab, mille tõttu segu vajas jahutamist reagenti lisamise ajal.

Pärast reaktsiooni lõpetamist ning lahustite roteerimist saadud tahket jääki pesti külma veega selleks, et saada lahti järele jäänud hüdrasiinist ning tema sooladest. Fmoc-hüdrasiini lahustuvus külmas vees on väga madal, ning sellepärast see ei põhjustanud olulisi kadusid. Petrooleetriga pesti tahket jääki mittepolaarsete lisandite kõrvaldamiseks. Jällegi, Fmoc-hüdrasiini lahustuvus külmas petrooleetris on halb, ning seetõttu see operatsioon ei põhjustanud suuri kadusid.

Pärast produkti kuivatamist saadi produkt valge tahkise kujul, saagis 89% teoreetilisest. Produkt on TLC järgi puhas.

4.2 Bensüülkarbasaat (Z-NHNH₂)

Sarnaselt Fmoc-hüdrasiini saamise protseduuriga kasutati selles reaktsioonis diatsüülimise vältimiseks ning tekkinud HCl sidumiseks suurt hüdrasiini ülehulka. Inertne atmosfäär, intensiivne segamine, jäävannil jahutamine ja reagenti tilkahaaval lisamine tõstsid soovitud aine saagist veelgi. Kuna Z-Cl lahustub hästi ACN-s, kasutati võrreldes eelmise reaktsiooniga väikest solvendi kogust. Pärast reaktsiooni lõppu lahusti eemaldati, jääk lahustati EA-s ning ekstraheeriti veega hüdrasiini ja tema soolade eraldamiseks. Küllastatud NaCl lahusega pesemisel kõrvaldati osa EA-s lahustunud vett. Ülejäänud veest saadi lahti veevaba Na₂SO₄ abil.

Diatsüülitud produkt eraldati soovitud ainest kolonnkromatograafiliselt, kasutades eluendiks puhast EA. Z-hüdrasiin on üsna polaarne ning tema R_f sellise eluendiga on umbes 0,5. Diatsüülhüdrasiin on aga oluliselt mittepolaarsem ning nii polarse eluendiga liigub ta

frondiga koos, mille tõttu oli võimalik aineid väga hästi eraldada. Saadi valge tahke aine, saagis 85% teoreetilisest.

4.3 *tert*-butüül 4-metüülfenüülkarbonaat (O-Boc-p-kresool)

p-Kresooli hüdroksüülrühma kaitsmisel *tert*-butüüloksükarbonüülrühmaga kasutati väikest Boc-anhüdriidi ülehulka (1.05 ekv). See võimaldas reaktsiooni kiiremat kulgemist. Väike kogus DMAP-i käitus katalüsaatorina. Reaktsiooni käigus eraldus tekkiva *t*-butüülkarbonaadi lagunemisel süsihappegaas ja isobutüleen.

Pärast reaktsiooni lõppu ekstraheeriti reaktsioonisegu, kus lahustiks oli EA, lahja KHSO₄ vesilahusega DMAP-i sidumiseks. Siin tuleb silmas pidada, et Boc- kaitserühm on hapete suhtes tundlik ning kasutada tuleb lahjat lahust ning teostada operatsioon võimalikult kiiresti. Hapetest lahtisaamiseks pesti segu küllastatud NaHCO₃ lahusega.

Ekstraheerimisel saadud lahuse roteerimisel ning järgneval vakumeerimisel saadi produkt 99% saagisega. Aine on kollaka tooniga, kuigi peab olema valge. Vaatamata sellele on aine TLC uuringu järgi puhas ning seetõttu kasutatakse teda järgnevas reaktsioonis ilma täiendava puhastamiseta. Kollaka tooni esinemist võib seletada sellega, et lähteaineks kasutatud p-kresool oli ka samasuguse värvusega.

4.4 4-(*tert*-butüüloksükarbonüüloksü)bensüülbromiid

Antud reaktsioonis kasutati broomi allikana N-broomsuktsiinimiidi väikest ülehulka (1.05 ekv). See soodustas reaktsioon kiiremat lõpuni kulgemist. Kuna reaktsioon on radikaalmehhanismiga, siis vajab ta initsieerijat, milleks siin kasutati dibensoüülperoksiidi katalüütilises koguses. Radikaalne broomimine aitas vältida aromaatsse tuuma broomimist, mis oli probleemiks eelnevates töödes (Mastitski, 2015). TLC järgi toimus reaktsioon väga selektiivselt ning tekkis ainult üks produkt.

Reaktsiooni käigus moodustunud suktsiinimiidi eemaldamiseks kasutati ära NBS head ning suktsiinimiidi halba lahustuvust CCl₄-s. See võimaldas nende ainete eraldamist filtreerimise teel. Sademe pesemine filtril väikese koguse külma CCl₄-ga aitas kätte saada sademesse jäänud soovitud produkti. Lahusti roteerimisel saadi kergelt kollakas tahkis. Kuna saadud aine peaks olema valge, siis saab produktis värvust seletada lähteaines oleva

lisandiga. Produkti saagis oli 99% teoreetilisest saagisest ning saadud ainet kasutati järgnevatel reaktsioonides ilma täiendava puhastamiseta.

4.5 Kaitstud hüdrasiinide bensüülimine

Skeem: vt. „3.3.2 KI katalüüsitud kaitstud hüdrasiinide bensüülimine,,. Kuna see reaktsioon toimub tõenäoliselt S_N2 mehhanismi järgi, siis lahustiks valiti polaarne aprotoonne lahusti ACN. See omakorda soodustab ka Finkelsteini reaktsiooni, mis on samuti S_N2 reaktsioon. Reaktsioonisegusse lisati sobivat alust, et nihutada reaktsiooni tasakaalu saaduste poole tekkiva HCl sidumise teel. Kuna Fmoc-kaitserühm on tugevamate aluste suhtes ebastabiilne, siis reaktsioonis Fmoc-hüdrasiiniga kasutati 2,4,6-trimetüülpüridiini, mis on nõrgem alus kui DiPEA. Lisaks sellele kasutati reaktsioonis 3-kordset kaitstud hüdrasiini ülekaalu, et suurendada monoalküülitud produkti saagist. Reageerimata hüdrasiini on aga võimalik taaskasutada.

Hüpoteesi kohaselt toimub reaktsioonisegus Finkelsteini reaktsioon ning alküülbromiid/kloriid asendub alküüljodiidiga ja tekib KBr/KCl. Selle oletuse kontrollimiseks teostati mõned katsed nii KI lisamisega kui ka ilma, hoides kõik ülejäänud tingimused konstantsetena.

Katsetes leiti järgmist. Esiteks, pärast alküülhalogeniidi lisamist tekkis reaktsioonisegus mõne minuti jooksul valge hägu. See viitab asjaolule, et Finkelsteini reaktsioon töötas ja tekkis atsetonitriilis raskesti lahustuv KBr või KCl. Teiseks, reaktsioonide kulgemist jälgiti TLC plaatide abil iga 2 tunni tagant. Plaatide võrdlemisel oli selgelt näha, et sama reaktsioonaja jooksul oli neis segudes, kuhu ei lisatud KI, tekkinud oluliselt vähem produkti. Täpsem analüüs näitas, et neis reaktsioonisegudes, kuhu lisati KI, oli reaktsioon 6 tunni jooksul praktiliselt lõpuni jõudnud. Samas olid ilma KI lisandita reaktsioonisegudes 6 tunni pärast näha ainult produktide jäljed. Selleks, et produkti siiski määrata, pikendati ilma KI lisamiseta tehtud katsete aega 24 tunnini.

Erandiks oli Boc-hüdrasiin, kus KI lisamine reaktsiooni oluliselt ei kiirendanud. Samas oli aga ka ilma KI lisandita saadud monoalküülitud produkti saagis kõrgem kui teiste hüdrasiinide korral.

Lisatõestust üleval püstitatud hüpoteesile andis ka ainete saagiste võrdlemine. Fmoc- ja Z-hüdrasiinide puhul olid saagised 6 t jooksul koos KI-ga ~50%, ilma KI lisamiseta aga 24 t jooksul ainult 20-30%. Boc-hüdrasiini korral erinevus ei olnud nii suur, kuid oli ikkagi

märgatav. Boc-hüdrasiini paremat reaktsioonivõimet võib seletada kaitserühma iseloomuga – Fmoc- ja Z- rühmad on mõlemad elektronaktseptorsed rühmad, kuid Boc- rühm on elektrondonoorne, mis omakorda võib tõsta hüdrasiini $-NH_2$ nukleofiilsust. Nendest tulemustest on selgelt näha, et KI lisamine katalüsaatorina aitab kiirendada reaktsiooni ja tõsta monoalküülitud produkti saagist.

4.6 Kaitstud hüdrasiinide alküülimine halogenoetaanhappe estritega

Skeem: vt „3.4.6 Üldine protseduur kaitstud hüdrasiinide alküülimiseks halogenoetaanhappe estritega“. See katsete seeria teostati üldjoontes analoogselt eelmisega. Ainukesed erinevused seisnesid selles, et kasutati kaitstud hüdrasiini ja alküülhalogeniidi vahekorras 1:1, mis erines vahekorrast 1:3, mida kasutati eelmises katses. Lisaks sellele teostati katsed nii KI lisamisega kui ilma selle reagentita 24 tunni jooksul. Antud ühendite puhul on teine alküülimine oluliselt raskendatud võrreldes esimesega, mille tõttu 3-kordne kaitstud hüdrasiini ülehulk ei ole vajalik. Samas, arvestades seda, et reagentide vahekorra puhul 1:1 reaktsiooni kiirus väheneb oluliselt reaktsiooni lõpus, pikendati reaktsiooni aega 24 tunnini.

Tuleb märkida, et dialküülitud produkti tekkis antud reaktsioonides oluliselt vähem kui võrrelda bensüülamise reaktsioonidega. Lisaks sellele reaktsioon ei läinud lõpuni ka 24 tunni jooksul ning TLC plaatidel olid ikkagi üsna intensiivsed lähteainete laigud. Sellele vaatamata olid monoalküülitud produktide saagised ~50%.

Katsetes, mida teostati ilma KI lisamiseta, olid saagised oluliselt väiksemad, 10-20 %. Arvestades seda, et katsed ilma KI-ta olid teostatud täpselt samades tingimustes nagu katalüüsitud eksperimendid, tõestavad need tulemused KI katalüüsi efektiivsust kaitstud hüdrasiini alküülimise reaktsioonis.

5. Kokkuvõte

Püüdes muuta kaitstud hüdrasiinide otsese alküülimise reaktsiooni alküülkloriidide ja – bromiididega efektiivsemaks ja kiiremaks, uuriti käesolevas töös KI mõju neile reaktsioonidele. Katsed teostati kolme kaitstud hüdrasiiniga ning erinevate bensüülhalogeniididega ja halogenoetaanhappe estritega.

KI katalüüsi efektiivsuse testimiseks teostati katseid nii KI juuresolekul kui ka ilma, jättes kõik ülejäänud reaktsiooni tingimused samaks. Tulemustest selgus, et sama reaktsioonaja korral olid KI lisamisel teostatud katsetes monoalküülitud produktide saagised keskmiselt 2-2.5 korda kõrgemad võrreldes katsetega, kuhu KI ei olnud lisatud. Madala reaktsioonivõimega halogeeniidide korral aga ilma KI lisamiseta alküülimise reaktsiooni peaaegu ei toimunud. Need tulemused näitasid, et KI lisamine võimaldas tekitada alküüljodiide *in situ* oluliselt madalama reaktsioonivõimega alküülkloriididest ja – bromiididest ning teostada alküülimist ka nende madalamat reaktsioonivõimat omavate halogeniididega.

Töö tulemusena sünteesiti KI katalüüsi kasutades 15 erinevaid kaitserühmi kandvat asa-türosiini, asa-fenüülalaniini ja asa-aspargiinhape prekursorit, mille seas on 7 esmakordselt süntesitud ainet:

N-Z-N'-(4-*tert*butüüloksükarbonüül)bensüül hüdrasiin;

N-Fmoc-N'-(4-*tert*butüüloksükarbonüül)bensüül hüdrasiin;

N-Boc-N'-(4-*tert*butüüloksükarbonüül)bensüül hüdrasiin;

N-Z-N'-(4-metoksü)bensüül hüdrasiin;

N-Fmoc-N'-(4-metoksü)bensüül hüdrasiin;

tert-butüül *N-Z-N'*-hüdrasinoatsetaat;

tert-butüül *N-Boc-N'*-hüdrasinoatsetaat.

6. Summary

Potassium iodide catalysed alkylation of protected hydrazines

Bachelor Thesis By Aleksander Abramov

The effect of KI catalysis on alkylation of protected hydrazines with different alkyl chlorides and –bromides was examined. Experiments were performed using three protected hydrazines, and different benzyl halogenides and halogenoacetic acid esters.

To characterize the effectiveness of KI, experiments were performed in the presence and in the absence of this salt, keeping all other reaction conditions unchanged. It was found that in the presence of KI the yields of monoalkylated products were 2-2.5 times higher if compared with reactions where KI was absent (same reaction time). Moreover, reactions with less reactive alkyl halogenides practically did not proceed in the absence of KI. These results clearly demonstrate that KI is an efficient catalyst in these syntheses, generating alkyl iodides *in situ* and transforming less reactive alkyl chlorides into highly reactive alkyl iodides. As a result, by using potassium iodide catalysed alkylation reaction, 15 different aza-tyrosine, aza-phenylalanine, and aza-aspartic acid precursors bearing different protection groups were synthesized. Of those, 7 precursors are not described in literature:

N-Z-*N'*-(4-*tert*butyloxycarbonyl)benzyl hydrazine;

N-Fmoc-*N'*-(4-*tert*butyloxycarbonyl)benzyl hydrazine;

N-Boc-*N'*-(4-*tert*butyloxycarbonyl)benzyl hydrazine;

N-Z-*N'*-(4-methoxy)benzyl hydrazine;

N-Fmoc-*N'*-(4-methoxy)benzyl hydrazine;

N-Z-hydrazinoacetic acid *tert*-butyl ester;

N-Boc-hydrazinoacetic acid *tert*-butyl ester;

Tänuavaldus:

Sooviksin tänada oma juhendajat Anton Mastitskit, tänu kelle toetusele ja arvututele nõuannetele sain selle töö valmis. Lisaks tänan ka kõiki orgaanilise keemia õppetooli kolleege, kes panustasid väga palju minu laboritöö oskuse arenemisele.

Lisaks sellele olen ma tänulik ka oma vanematele ning teistele lähedastele inimestele nende toetuse ja armastuse eest väljaspool laborit.

Kasutatud kirjandus

1. Rothgery, E. F. (2004) „Hydrazine and Its Derivatives“. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*
2. *Handbook of Chemistry and Physics* (83rd ed.). CRC Press. 2002.
3. Ragnarsson U. (2001) „Synthetic methodology for alkyl substituted hydrazines“. *Chem. Soc. Rev.*, 30, lk 205-213
4. Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H. (1985) “Аминокислоты, пептиды, белки”. Москва, “Мир”, lk. 83, 84.
5. Bondebjerg J. *et al* (2005) “Novel semicarbazide-derived inhibitors of human dipeptidyl peptidase I (hDPPI)”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (14), lk 4408-4424
6. Miller S. M. *et al* (1995) „Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers“. *Drug Development Research*, 35 (1), lk 20-32
7. Venkatraman, S., Wu W., Shih N-Y., Njoroge F.G. (2009) „Potent aza-peptide derived inhibitors of HCV NS3 protease“. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (16) lk 4760-4763
8. Edwards J.O., Pearson R. G. (1962) „The Factors Determining Nucleophilic Reactivities“. *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1), lk 16–24
9. Proulx C. *et al* (2011) “Azapeptides and their therapeutic potential”. *Future Med. Chem.* 3(9), lk 1139–1164
10. Mastitski A., Haljasorg T., Kipper K., Järv J. (2015) “Synthesis of aza-phenylalanine, aza-tyrosine, and aza-tryptophan precursors via hydrazine alkylation”. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 64 (2), lk 168-178
11. Mastitski, A., Kisseljova, K., Järv, J., (2014) “Synthesis of the Fmoc-aza-Arg(Boc)₂ precursor via hydrazine alkylation”. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 63 (4), lk 438–443
12. Mäeorg U., Pehk T., Ragnarsson U. (1999) “Synthesis of substituted hydrazines from triprotected precursors”. *Acta Chemica Scandinavica*, 53 (12), lk 1127-1133
13. Bredihhin A., Groth U. M., Mäeorg U. (2007) „Efficient Methodology for Selective Alkylation of Hydrazine Derivatives“. *Org. Lett.*, 9 (6), lk 1097–1099

14. Hart M., Beeson C. (2001) „Utility of Azapeptides As Major Histocompatibility Complex II Protein Ligands for T-Cell Activation“. *J. Med. Chem.* 44, lk 3700-3709
15. Smith, Michael B.; March, Jerry (2007) *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure (6th ed.)*, New York: Wiley-Interscience
16. Romera J. L., Cid J. M., Trabanco A. A. (2004) “Potassium Iodide Catalysed monoalkylation of anilines under microwave irradiation”. *Tetrahedron Letters*, 45, lk 8797–8800
17. Finkelstein (1910), *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 43, lk 1528.
18. Streitweiser A. Jr (1956) „Solvolytic Displacement Reactions At Saturated Carbon Atoms“. *Chem. Rev.*, 56 (4), lk 571–752
19. <http://www.sigmaaldrich.com/finland.html> (20.05.2016)
20. Boeglin, D., Lubell, W.D. (2005) “Aza-Amino Acid Scanning of Secondary Structure Suited for Solid-Phase Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry and Aza-Amino Acids with Heteroatomic Side Chains”. *J. Comb. Chem.*, 7 (6), lk 864-878.
21. Jurmann G. et al. (2005) “Investigation of the oxidation ability of protected hydrazine derivatives”. *Journal of Chemical Research*, (10), lk 661-662
22. McKay F. C., Albertson, N. F. (1957) “New amine-masking groups for peptide synthesis”. *Journal of the American*, 79, lk 4686-4690.
23. Kiss L. E. et al. (2012) “Design, synthesis, and structure-activity relationships of 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones as novel FAAH inhibitors”. *MedChemComm*, 2 (9), lk 889-894
24. Wieczerek E. et al. (2002) “The efficient synthesis of azaamino acids”. *Polish Journal of Chemistry*, 76 (12), lk 1693-1697
25. Niedrich H. (1965) “Hydrazino acids as heterocomponents of peptides. VI. Hydrazinoacetic acid derivatives and their use for the synthesis of hydrazine- and N-aminopeptides”. *Chemische Berichte*, 98 (11), lk 3451-3461.
26. Peifer M. et al. (2009) “Oligonucleotide Analogues with Integrated Bases and Backbone. Part 20”. *Helvetica Chimica Acta*, 92 (6), lk 1134-1166

Lisa:

TMR spektrid

Aine valem/nimetus	Aine kood
Fmoc-NHNH ₂	
Z-NHNH ₂	
tert-butüül 4-metüülfenüülkarbonaat	1
4-(tert-butüüloksükarbonüüloksü)bensüülbromiid	2
<i>N</i> -Z- <i>N'</i> -(4-tertbutüüloksükarbonüüloksü)bensüül hüdrasiin	3
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -(4-tertbutüüloksükarbonüüloksü)bensüül hüdrasiin	4
<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(4-tertbutüüloksükarbonüüloksü)bensüül hüdrasiin	5
<i>N</i> -Z- <i>N'</i> -bensüül hüdrasiin	6
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -bensüül hüdrasiin	7
<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -bensüül hüdrasiin	8
<i>N</i> -Z- <i>N'</i> -(4-metoksü)bensüül hüdrasiin	9
<i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -(4-metoksü)bensüül hüdrasiin	10
<i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -(4-metoksü)bensüül hüdrasiin	11
tert-butüül <i>N</i> -Z- <i>N'</i> -hüdrasinoatsetaat	12
tert-butüül <i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -hüdrasinoatsetaat	13
tert-butüül <i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -hüdrasinoatsetaat	14
etüül <i>N</i> -Z- <i>N'</i> -hüdrasinoatsetaat	15
etüül <i>N</i> -Fmoc- <i>N'</i> -hüdrasinoatsetaat	16
etüül <i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -hüdrasinoatsetaat	17

Infoleht

Töös uuriti KI katalüüsi kasutamist kaitstud hüdrasiinide alküülimisel bensüülhalogeniidide ja halogenoetaanhappe estritega. KI katalüüsi efektiivsuse testimiseks teostati katseid nii KI juuresolekul kui ka ilma, jättes kõik ülejäänud reaktsiooni tingimused samaks. Tulemustest selgus, et sama reaktsiooniaja korral olid KI lisamisel teostatud katsetes monoalküülitud produktide saagised keskmiselt 2-2.5 korda kõrgemad võrreldes katsetega, kuhu KI ei olnud lisatud. Madala reaktsioonivõimega halogeeniidide korral aga ilma KI lisamiseta alküülimise reaktsiooni peaaegu ei toimunud. Need tulemused näitasid, et KI lisamine võimaldas tekitada alküüljodiide *in situ* oluliselt madalama reaktsioonivõimega alküülkloriididest ja – bromiididest ning teostada alküülimist ka nende madalamat reaktsioonivõimet omavate halogeniididega.

Märksõnad: aza-peptiidid, aza-aminohapete prekursorid, hüdrasiin, alküülimine, kaaliumjodiid, Finkelsteini reaktsioon.

Infosheet

KI catalysed reactions of protected hydrazine alkylation by benzyl halogenides and halogenoacetic acid esters were studied. To characterize the effectiveness of KI, experiments were performed in the presence and in the absence of this salt, keeping all other reaction conditions unchanged. It was found that in the presence of KI the yields of monoalkylated products were 2-2.5 times higher if compared with reactions where KI was absent (same reaction time). Moreover, reactions with less reactive alkyl halogenides practically did not proceed in the absence of KI. These results clearly demonstrate that KI is an efficient catalyst in these syntheses, generating alkyl iodides *in situ* and transforming less reactive alkyl chlorides into highly reactive alkyl iodides.

Keywords: aza-peptides, aza-amino acid precursors, hydrazine, alkylation, potassium iodide, Finkelstein reaction.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Aleksander Abramov,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Kaaliumpjodiidi katalüüsitud kaitstud hüdrasiinide alküülimine“,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Anton Mastitski,

(juhendaja nimi)

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **02.06.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **24.05.2016**